

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-281246

(43)Date of publication of application : 10.10.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 33/543
G01N 33/566
G01N 37/00

(21)Application number : 2001-000482

(22)Date of filing : 05.01.2001

(71)Applicant : NISSHINBO IND INC

(72)Inventor : KIMURA NAOKI
ICHIHARA TATSUO
MORIYA SHIYOUO

(30)Priority

Priority number : 2000021843 Priority date : 26.01.2000 Priority country : JP

(54) METHOD FOR DETECTING IMMOBILIZATION NUCLEIC ACID AND NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for immobilizing a nucleic acid onto a base simply, efficiently, and easily, a method for detecting nucleic acid by hybridization using the same method with high sensitivity, and the nucleic acid and a nucleic acid immobilization base that are used for the methods.

SOLUTION: In a nucleic acid, a polymer containing a compound having a non-saturation connection is connected to one or both of 3' or 5' terminal in the hybridization of nucleic acids using the immobilization nucleic acid. The nucleic acid being immobilized onto the base is used as the immobilization nucleic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード ⁸ (参考)
G01N 33/53		G01N 33/53	M 4B024
C12M 1/00		C12M 1/00	A 4B029
C12N 15/09		C12Q 1/68	A 4B063
	ZNA	G01N 33/543	525 E
C12Q 1/68		33/566	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全11頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2001-482 (P 2001-482)	(71) 出願人	000004374 日清紡績株式会社 東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号
(22) 出願日	平成13年1月5日 (2001. 1. 5)	(72) 発明者	木村 直紀 千葉県千葉市緑区大野台1-2-3 日清 紡績株式会社研究開発センター内
(31) 優先権主張番号	特願2000-21843 (P2000-21843)	(72) 発明者	市原 竜生 千葉県千葉市緑区大野台1-2-3 日清 紡績株式会社研究開発センター内
(32) 優先日	平成12年1月26日 (2000. 1. 26)	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉 (外2名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固定化核酸及び核酸の検出法

(57) 【要約】

【課題】 基材上に核酸を簡便に効率よく、かつ、簡易に固定化する方法、同方法を用いてハイブリダイゼーションによる核酸の検出を高感度で行う方法、ならびにこれらの方法に用いる核酸及び核酸固定化基材を提供する。

【解決手段】 固定化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションにおいて、3'又は5'末端の一方又は両方に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合した核酸であって、基材上に固定化された核酸を固定化核酸として用いる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 固定化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固定化される核酸であって、3'又は5'末端の一方又は両方に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合した核酸。

【請求項2】 前記ポリマーの平均重合度が3以上で100以下である請求項1記載の核酸。

【請求項3】 前記ポリマーを構成するモノマーがヌクレオチドである請求項2記載の核酸。

【請求項4】 核酸固定化用基材と、この基材上に固定化された請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸とを有する核酸固定化基材。

【請求項5】 核酸固定化用基材と請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸を接触させ、接触部に電磁波を照射することを含む核酸固定化基材の製造法。

【請求項6】 固定化核酸を用いたハイブリダイゼーションによる核酸の検出法において、請求項4記載の核酸固定化基材を用いることを特徴とする核酸の検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ハイブリダイゼーションによる核酸の検出に関し、詳しくは、ハイブリダイゼーションによる核酸の検出法、並びに同方法に用いる核酸及び核酸固定化基材に関する。

【0002】

【従来の技術】臨床検査、食品検査、法医学検査等の分野において、検体中に存在する核酸、抗体、抗原等生物学的に活性な物質を検出する方法として、目的物質に応じて核酸プローブ法、酵素免疫測定法等が用いられている。

【0003】核酸を検出する方法としては、病原微生物等の菌種同定、法医学におけるDNA鑑定等がある。これらの方法では、通常、以下のように検出が行われる。標的となる核酸と相補的な配列を有する核酸を酵素等で直接、またはハプテン等を介して間接的に標識する。この標識核酸と標的となる核酸をハイブリダイズさせる。ハイブリダイズしなかった標的核酸を除くかまたは標識部分を不活性化した後、標識部分を検出することにより標的核酸の存在及び量を確認する。

【0004】従来の核酸検出法においては、チューブ、マイクロタイタープレート、メンブレンフィルター、ビーズ等の固相表面に核酸を固定化することが非常に重要である。そのため、核酸を固定化する種々の方法が公表されている。

【0005】例えば、

① 5'末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材との間のジスルフィド結合による固定 (P. J. R. Day, P. S. Flora, J. E. Fox, M. R. Walker, Biochem. J., 278, 735-740(1991)) 等のような修飾基を導入した核酸を基材に化学結合させる方法、

② 核酸を、UV照射あるいは加熱処理によりニトロセルロース、ポリ-L-リジンまたはナイロンメンブレン等上に吸着固定 (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, page 2.109-2.113 and page 9.34-9.46、特表平10-503841号) したり、マイクロプレート上に物理吸着させ固定 (G. C. N. Parry and A. D. B. Malcolm, Biochem. Soc. Trans., 17, 230-231(1989)) したりする等の物理吸着で固定する方法、

③ 基材上に結合させたヌクレオチドを用い、基材上でDNAを合成する方法 (WO97/10365)、等が知られている。

【0006】しかしながら、①の方法においては、極めて特殊な機械と試薬が必要となり、また、②の方法においては、ハイブリダイゼーションを行った場合、特に操作過程で基材から核酸が剥がれ落ち、結果として検出感度が下がる、再現性が得られない等の欠点がある。さらに、この方法では、長い核酸は固定化できるが、オリゴマー等の約50mer以下の短い核酸になると効率良く固定化できないという欠点がある。

【0007】また、③の方法においては、基材上でDNAを合成するために極めて特殊な機械と試薬が必要となり、さらに、合成できる核酸も25mer程度までに限られるという欠点がある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、基材上に核酸を簡便に効率よく、かつ、簡易に固定化する方法、及び同方法を用いてハイブリダイゼーションによる核酸の検出を高感度で行う方法、及びこの方法に用いる核酸及び核酸固定化基材を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため、検討を行った結果、核酸の3'又は5'末端の一方又は両方に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合した核酸が、短くても強固に固定化できること、さらにこのようにして核酸を基材に固定化したものを用いると、ハイブリダイゼーションによる核酸の検出感度を向上できることを見出し、本発明の完成に至った。

【0010】すなわち本発明は、以下の通りである。

(1) 固定化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固定化される核酸であって、核酸の3'又は5'末端の一方又は両方に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合した核酸。

(2) 前記ポリマーの平均重合度が3以上100以下である(1)記載の核酸。

(3) 前記ポリマーを構成するモノマーがヌクレオチドである(2)記載の核酸。

(4) 核酸固定化用基材と、この基材上に固定化された(1)～(3)のいずれか1項に記載の核酸とを有する

核酸固定化基材。

(5) 核酸固定化用基材と(1)～(3)のいずれか1項に記載の核酸を接触させ、接触部に電磁波を照射することを含む核酸固定化基材の製造法。

(6) 固定化核酸を用いたハイブリダイゼーションによる核酸の検出法において、(4)記載の核酸固定化基材を用いることを特徴とする核酸の検出法。

【0011】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

【0012】<1>核酸

本発明の核酸は、その3'又は5'末端の一方又は両方に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合した核酸である。すなわち、本発明の核酸は、ポリマー部分と、ハイブリダイゼーションに関与する領域(以下、便宜上「特異的領域」ともいう。)を含む部分とからなる。本発明の核酸の特異的領域を含む部分は、3'又は5'末端の一方又は両方にポリマーが結合していること以外は、通常の固定化(固相化)核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固定化核酸と特に変わることは無く、ハイブリダイゼーションが可能な核酸であれば特に制限されず、例えば、天然又は合成のDNA(オリゴヌクレオチドを含む)若しくはRNA(オリゴヌクレオチドを含む)が挙げられる。また、上記核酸は1本鎖であっても、2本鎖であっても構わない。また、特異的領域の長さは、ハイブリダイゼーションが可能な長さであれば特に制限されないが、通常5～100000塩基、好ましくは10～2000塩基程度である。

【0013】上記のような核酸の特異的領域を含む部分の3'又は5'末端、又は両末端にポリマーを結合する方法としては、公知の方法を用いることができる。具体的には、例えば、市販されている核酸合成器を用いて、上記核酸の特異的領域を含む部分の3'又は5'末端、あるいは両末端に、ポリマーを構成する化合物として、チミン、ウラシル等の核酸塩基を有するヌクレオチドが少なくとも3塩基以上重合するように、一体として合成する方法等が挙げられる。

【0014】不飽和結合を有する化合物を含むポリマーとは、ポリマーを構成するモノマーの少なくとも一つが不飽和結合を有する化合物を含むポリマーを意味する。不飽和結合を有する化合物は、核酸が核酸固定化用基材に固定化されるのに十分に含まれていればよいが、ポリマーを構成するモノマーの全てが不飽和結合を有する化合物を含むことが好ましい。なお、「不飽和結合を有する化合物を含む」とは、不飽和結合を含む化合物の残基からなる又は該残基を含むことを意味する。

【0015】ポリマーの長さとしては、その平均重合度が3～100が好ましく、5～50がより好ましく、10～40が特に好ましい。

【0016】この平均重合度が2以下であると、十分な量の核酸を担体上に固定できないことがあり、また、重合度が101以上であると核酸製造工程で著しく収率が低下することがある。

【0017】ポリマーとしては、具体的には、アデニン、アデニン誘導体、シトシン、シトシン誘導体、グアニン、グアニン誘導体、チミン、チミン誘導体、ウラシル、ウラシル誘導体を塩基として有するヌクレオチド、アクリル酸又はメタクリル酸のエステル系モノマー、スチレン系モノマー、ポリオレフィン系モノマー、ビニル系モノマー、ニトリル系モノマー、エチレングリコールジアクリレート、エチレングリコールジメタクリレート、テトラエチレングリコールジアクリレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、テトラメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタアクリレート等から選ばれるモノマーが含まれるポリマーが挙げられ、ポリマー中の上記モノマーの種類は同一又は異なってもよい。好ましいモノマーはヌクレオチドである。

【0018】前記ポリマー中に、同ポリマーを構成するモノマーに核酸塩基を有するヌクレオチドを用いる場合、この核酸塩基と異なる塩基を有するヌクレオチドを挿入しておく、固定化核酸とハイブリダイズさせる試料核酸とのクロスハイブリダイゼーションを抑制することができる。例えば、ポリマーとしてポリT又はポリUを用いた場合、試料核酸中にポリA RNAが含まれていると、特異的領域の配列と無関係にハイブリダイズしてしまう可能性がある。このような場合であっても、ポリT又はポリU中に他の塩基を有するヌクレオチド又は任意の塩基と塩基対を形成しない化合物を挿入しておく、クロスハイブリダイゼーションが抑制される。このような化合物としては、例えば、アデニン誘導体、シトシン誘導体、チミン誘導体、グアニン誘導体、ウラシル誘導体等を有するヌクレオチド、プリン環及びピリミジン環を有しないデオキシリボ核酸及びリボ核酸、グルコース、ガラクトース、マルトース、アルキル基含有化合物、アルコキシ基含有化合物、アミノ基含有化合物、イミノ基含有化合物、水酸基含有化合物、ハロゲン含有化合物、スルホン酸含有化合物、カルボン酸含有化合物、ホスホン酸含有化合物等の、ポリヌクレオチドに挿入可能な公知の化合物を挙げることができる。また、挿入されるヌクレオチド又は化合物の長さは、通常には1～70分子程度である。挿入されるヌクレオチド又は化合物は連続していなくてもよい。

【0019】<2>核酸固定化用基材

本発明の核酸固定化用基材に用いる基材は、物理的吸着又は化学結合によって核酸を固定化することができ、通常のハイブリダイゼーションの条件に耐えうるものであれば特に制限されない。具体的には、核酸の固定及びハイブリダイゼーション等に用いる溶剤に不溶であり、か

つ常温若しくはその付近の温度範囲内（例えば0～100℃）で固体又はゲル状であるものが挙げられる。尚、基材が溶剤に不溶性であるとは、基材に後述のようにしてカルボジイミド基等の核酸に結合性を有する基を有する担体が担持され、次いで核酸が固定化され、その後、例えば、DNAチップ等として使用される際の各過程で用いられる水性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤に実質的に不溶性であることをいう。

【0020】このような基材の材質として、具体的には、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子、セラミック等が挙げられる。

【0021】上記プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミド及びアクリル樹脂等が挙げられる。

【0022】また、無機高分子として具体的には、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル及びグラファイト等が挙げられる。

【0023】また、金属として具体的には、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石、パラマグネット等が挙げられる。

【0024】また、天然高分子としては、ポリアミノ酸、セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸及びそれらの誘導体が挙げられる。

【0025】また、セラミックとして具体的には、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素及び炭化ホウ素等が挙げられる。

【0026】上記基材の形状としては、例えば、フィルム、平板、粒子、成形品（ビーズ、ストリップ、マルチウェルプレートのウェルまたはストリップ、チューブ、メッシュ、連続発泡フォーム、膜、紙、針、ファイバー、プレート、スライド及び細胞培養容器等）、ラテックス等を挙げることができる。また、それらの大きさについては、特に制限は無い。

【0027】上記基材に核酸を固定化するに当たって、基材に核酸を直接固定化してもよく、担体を基材に担持させて、担体を介して核酸を基材に固定化してもよい。担体としては、担体自体が核酸に結合性を有してもよく、核酸に結合性を有するリガンドを介して核酸を固定化できるものであってよい。ここで、「担持」とは、担体に核酸を固定化する際や核酸固定化基材をDNAチップ等として使用する際等に用いられる水溶性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤中で、基材から上記担体が実質的に脱離しないことを意味する。

【0028】本発明に用いられる上記担体は、上記基材上に担持される限り、単に物理的な接着性を利用して担持されていてもよく、また、化学的に共有結合等を介して担持されていてもよい。また、上記担体は、必要に応

じ、基材上の全面において担持されても、また、その一部において担持されてもよい。

【0029】担体としては、有機低分子、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子、セラミック等が挙げられる。

【0030】上記有機低分子として具体的には、カルボジイミド基含有化合物、イソシアネート基含有化合物、窒素イペリット基含有化合物、アルデヒド基含有化合物、アミノ基含有化合物等が挙げられる。

【0031】また、プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミド及びアクリル樹脂等が挙げられる。

【0032】また、無機高分子として具体的には、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル及びグラファイト等が挙げられる。

【0033】また、金属として具体的には、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石、パラマグネット等が挙げられる。

【0034】また、天然高分子としては、ポリアミノ酸、セルロース、キチン、キトサン及びそれらの誘導体が挙げられる。

【0035】また、セラミックとして具体的には、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素及び炭化ホウ素等が挙げられる。

【0036】このような担体は、上記基材に対して高い接着性を有するものであり、この接着性を利用して基材に担持されるものである。尚、前記担体が基材上に物理的な接着性を利用して担持される際の代表的な形態は皮膜である。

【0037】前記基材上に前記担体を皮膜で担持させる方法としては、スプレー、浸漬、ブラッシング、スタンプ、蒸着、フィルムコータを用いたコーティング等の公知の方法を用いることができる。

【0038】例えば、ガラス基材の表面全体にカルボジイミド基（樹脂）を導入する方法については、まず、3-アミノプロピルトリエトキシシラン等のアミノ置換オルガノアルコキシシランを適当な溶媒に溶解して得られた溶液に70～80℃程度の温度条件下でガラス基材を概ね2～3時間程度浸漬した後、これを取り出して水洗し、さらに、100～120℃程度で約4～5時間加熱乾燥する。乾燥後、適当な溶媒中に浸し、カルボジイミド樹脂を加え30～170℃程度の温度条件下で12時間程度攪拌し、洗浄すればよい。また、上記3-アミノプロピルトリエトキシシランのアミノ基と窒素イペリット基の核酸結合基以外の官能基を適当な溶媒を用いて反応させ、ガラス基材の表面に窒素イペリット基を導入することもできる。

【0039】また、ガラス基材にアミノ基以外場合や、基材がガラス以外の材料からなる場合においても、上記基材の説明で挙げた各種材料表面に種々の官能基を導入することは、従来より一般的に行われていることであり、その方法も公知であるので、このような公知の方法を用いて基材表面への官能基の導入を行うことができる。

【0040】さらに、上記で挙げた基材のプラスチック基材の中には、基材表面に既に上記のような官能基を有するものもあり、この場合には基材表面に官能基を導入することなしに、これをそのまま担体の製造に用いることも可能である。また、このようなプラスチック基材であってもさらに官能基を導入して上記担体の製造に用いることも可能である。

【0041】また、上記担体または基材、あるいは担体及び基材の材料に公知の光重合開始剤を混合することもできる。光重合開始剤を混合することによって、紫外線等の電磁波の照射による核酸の固定化の際の反応性が向上し得る。

【0042】<3>核酸固定化基材

上記核酸を核酸固定化用基材上に固定化すると、本発明の核酸固定化基材が得られる。核酸を固定化するに際し、基材上に核酸を点状に固定化することが好ましい。点状に固定化されるとは、基材の大きさに対して、核酸固定部位が複数個所設けられる程度に充分小さいことをいう。前記点の形状は、特に制限されず、核酸固定化基材の使用形態、用途等により適宜選択されうる。

【0043】本発明の核酸固定化基材に固定化される核酸としては、上記<1>で挙げた核酸が特に制限無く挙げられる。

【0044】また、上記本発明の核酸固定化基材において点状に固定化されている核酸は同一であっても異なってもよく、異なる核酸を用いる場合の各核酸の配置等については、得られる核酸固定化基材の使用形態、用途等により適宜選択されうる。また、固定化される核酸は混合物であってもよい。

【0045】このような核酸を上記担体に点状に固定化するには、担体上に、適当な条件下で、微量の核酸を所望の大きさの点状に供給することで、担体と核酸を接触させ固定化すればよい。

【0046】具体的には、例えば、両者の接触反応において固定化される核酸の活性が維持されるように、通常、核酸は水またはバッファー中に含まれる形で供給される。また、両者の接触中又は接触後に電磁波を照射することによって固定化することもできる。また、上記水またはバッファー中に公知の光重合開始剤を混合することもできる。

【0047】この固定に用いる電磁波としては、220 nm～380 nmの波長の紫外線が好ましく、その照射量は、10～5000 mJ/cm²が好ましく、100～2

000 mJ/cm²がさらに好ましい。さらに、照射する紫外線のスペクトルの形状は、100 nm以下の半値幅を持ったものが好ましいが化合物（不飽和結合を有する化合物を含むポリマー）の吸収スペクトルの形状によって適宜選択することができる。

【0048】核酸とカルボジイミド樹脂、窒素イペリット、ポリアミノ酸、ニトロセルロース等の公知の化合物を化学的に結合又は物理的に結合した状態で、これら混合物と担体を接触させ固定させてもよく、また、このときの固定は前記電磁波を照射して行ってもよい。

【0049】本発明において微量の核酸を、通常は、核酸を含有する水またはバッファーを、基材または基材上の担体に点状に供給する手段として、ディスペンサを用いる方法、ピンを用いる方法、パブルジェットを用いる方法等が挙げられるが、本発明がこれらに限定されるものではない。また、このように溶液を微量に供給する装置は、一般に市販されており、本発明においてもこれらを用いることが可能である。

【0050】本発明の核酸固定化用基材は、これを用いて分析等を行う際に、上記固定化核酸以外の核酸等を接触させる機会が多いが、基材または基材上の担体に担持された未反応核酸固定部分に上記固定化核酸以外の核酸等が非特異的に結合することを防ぐため、上記のようにして点状に核酸を基材または基材上の担体に固定化した後に、過剰量のウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、サケ精子DNA等を基材または基材上の担体に接触させ、未反応核酸固定部分をブロックしておくことが好ましい。

【0051】このようにして得られる本発明の核酸固定化基材は、前記核酸が担体に非常に強固に担持されたものであり、ハイブリダイゼーション等で広く使用されている洗浄方法（界面活性剤を用いた洗浄方法）によっても脱離することがなく、これを用いて分析等を行った場合、再現性および定量性に優れた分析が可能となる。また、本発明の核酸固定化基材は、核酸が、鎖の数や長さに制限されずに固定され得るので、同一基材上で種々の核酸を同時に取り扱うことができる。

【0052】これらのことから、本発明の核酸固定化基材は、多数の核酸を用いてハイブリダイゼーション法により塩基配列を決定する技術、SBH (Sequencing By Hybridization) 法、SHOM (Sequencing by Hybridization with Oligonucleotide Matrix) 法等に用いられるDNAチップ（DNAマイクロアレイ）等に優れた性能を持って適用可能であるといえる。

【0053】また、本発明の核酸固定化基材は、ハイブリダイゼーションによる核酸の回収にも好適に用いることができる。

【0054】

【実施例】以下、実施例により本発明を説明する。

【0055】

【製造例】 カルボジイミド化スライドガラスの作製

(1) アミノ化スライドガラスの作成

蒸留水180mlに10% (v/v) 3-アミノプロピルトリエトキシシラン/エタノール溶液20mlを加え攪拌した。そこに6N HClを加え、pH3~4に調整した後、スライドガラスを15枚浸漬し、75℃にて2時間加熱処理した。加熱終了後、スライドガラスを溶液から引き上げ、蒸留水でよく洗い流した後、115℃にて4時間加熱処理して、アミノ化スライドガラスを得た。

【0056】 (2) カルボジイミド樹脂の作製

ヘキサメチレンジイソシアナート (アルドリッチ社製) 117.9gにイソシアン酸シクロヘキシル (東京化成社製) 12.5g及び3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド (アルドリッチ社製) 1.3gを加えた。次いで、窒素を流速0.5ml/分で加えながら、185℃にて96時間攪拌した。冷却後、カルボジイミド樹脂を粉末として得た。得られた樹脂の平均重合度は10であり、数平均分子量は2400であった。

【0057】 (3) カルボジイミド化スライドガラスの作製

前記(2)で作製したカルボジイミド樹脂の10%クロロホルム溶液を作製し、これに(1)で作製したアミノ化スライドガラスを15枚浸漬し、直ちに引き上げた。次いで、クロロホルム200mlによる10分間の洗浄を2回行った後、40℃で2時間乾燥して、カルボジイミド化スライドガラスを得た。

【0058】

【実施例1】 (1) 末端に重合した塩基を有する核酸の固定

配列番号1に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(31mer)を、100ng/μlになるように2M NaClに溶解し、DNA溶液とした。スポック(SPBIO: 日立ソフトウェアエンジニアリング(株)社製)を用い、上記製造例で得たカルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に、前記DNA溶液を500箇所スポットした。これを乾燥機に入れ、37℃にて15分間乾燥した。次いで、3%BSA(ウシ血清アルブミン)を含む緩衝液A(0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸(pH7.5)、0.05%トライトンX-100)に浸し、37℃にて15分間乾燥した。次に、このスライドガラスをTE緩衝液(10mMトリス塩酸、pH7.2/1mMEDTA)で洗浄後、37℃にて15分間乾燥した。

【0059】一方、コントロールとして、後述のプロープと全く相補性を示さないオリゴマー(配列番号3)も同様に、カルボジイミド化スライドガラスに固定化した。

【0060】 (2) ハイブリダイゼーション

上記のスライドガラスのDNAを固定化した部分に、ハイブリダイゼーション溶液[3×SSC(SSC:1.5MNaCl、0.15Mクエン酸ナトリウム)、10%デキストラン、1pmolビオチン化プロープ]30μlをのせ、42℃のウォーターバスで1晩加熱した。

尚、プロープ核酸には、シゲラ(Shigella)属細菌由来のシガ様毒素(Shiga-like toxin)タイプ2遺伝子を、ビオチン標識したプロープを用いてPCRにより増幅し、得られた増幅産物(約1.2kb)を用いた。

10 【0061】 (3) ポストハイブリダイゼーション
ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取り、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、非特異的に吸着したプロープを除去した。

【0062】 [ポストハイブリダイゼーション洗浄液及びその条件]

(i) 2×SSC、1% SDS; 室温、5分間、2回

(ii) 0.2×SSC、1% SDS; 40℃、5分間、2回

20 (iii) 2×SSC; 室温、5分間、1回

【0063】 (4) ハイブリダイゼーションの検出

3%BSAを含む緩衝液A500mlに、上記ポストハイブリダイゼーション洗浄後のスライドガラスを浸漬し、室温で30分間ブロッキングを行った。次に、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート溶液(3%BSAを含む下記組成の緩衝液Aで原液(ペーリンガーマイハイム社製)を2000倍に希釈したもの。)45mlに浸し、室温で30分間反応させた。次に、スライドガラスを緩衝液A50mlに浸し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返し、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。次にスライドガラスを下記組成の緩衝液B30mlで1回洗浄した。最後に基質溶液(緩衝液B20ml、BCIP(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート)溶液18μl、NBT(ニトロブルー-テトラゾリウム)溶液36μl)に浸し、室温で3時間放置し、発色反応を行った。その結果を表1に示す。

【0064】 [緩衝液Aの組成]

0.2M NaCl

40 0.1M トリス塩酸(pH7.5)

0.05% トライトンX-100

[緩衝液Bの組成]

0.1M NaCl

0.1M トリス塩酸(pH9.5)

【0065】

【比較例1】実施例1の(1)~(4)において、配列番号1に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(31mer)の代わりに配列番号2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(21mer)を用いた以外は、実施例1と同様にしてハイブリダイゼーション及び発色反応

を行った。その結果を表1に示す。

【0066】

【表1】

表1

シグナル検出	
実施例1	◎
比較例1	○

◎：大部分のシグナルが非常に高感度かつ非常に明瞭にあらわれた。

○：大部分のシグナルが高感度かつ明瞭にあらわれた。

【0067】表1の結果から、本発明の核酸の検出方法によれば、核酸の検出が非常に高感度かつ非常に明瞭なシグナルとしてあらわれることがわかる。

【0068】一方、コントロールとして上記プローブと全く相補性を示さないオリゴマーも同様に固定化した。その場合は、実施例1及び比較例1のいずれににおいても、シグナルは、全く現れなかった。

【0069】

【実施例2】(1) 末端に重合した塩基を有する核酸の固定

配列番号4～配列番号12に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(18～28mer)を、100ng/μlになるように2M NaClに溶解しDNA溶液とした。スプッター(GT MASS：日本レーザー電子(株)社製)を用い、上記製造例で得たカルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に、前記DNA溶液を2点ずつスポットした。次いで、UV STRAHLINKER[®]を用いてUV照射(波長：254nm、600mJ/cm²)を行なった。次いで、3%BSA(ウシ血清アルブミン)を含む緩衝液A(0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸(pH7.5)、0.05%トライトンX-100)に浸し、37℃にて15分間乾燥した。次に、このスライドガラスをTE緩衝液(10mMトリス塩酸(pH7.2)/1mM EDTA)で洗浄後、37℃にて15分間乾燥した。

【0070】(2) ハイブリダイゼーション

上記のスライドガラスのDNAを固定した部分に、ハイブリダイゼーション溶液[3×SSC(SSC：1.5M NaCl、0.15Mクエン酸ナトリウム)、10%デキストラン、1pmol Cy5標識プローブ]30μlをのせ、42℃のウォーターバスで1晩加熱した。尚、プローブ核酸には、RNAポリメラーゼβサブユニット(rpob)遺伝子を、Cy5標識したプローブを用いてPCRにより増幅し、得られた増幅産物(約110b)を用いた。

【0071】(3) ポストハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからハイ

ブリダイゼーション溶液を軽く吸い取り、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行ない、非特異的に吸着したプローブを除去した。

【0072】[ポストハイブリダイゼーション洗浄条件及びその条件]

(i) 2×SSC、0.1%SDS；室温5分間、2回

(ii) 0.3×SSC、0.1%SDS；40℃、5分間、2回

(iii) 2×SSC；室温、5分間

10 【0073】(4) ハイブリダイゼーションの検出

得られたスライドガラスをSCAN ARREY(GSI(株)社製)を用いて測定した。その結果を表2に示す。表2中の配列4～配列12はそれぞれ配列番号4～12に示す塩基配列であり、その特徴は以下の通りである。配列4：末端にT塩基を付加した相補鎖、配列5～配列7：末端にT塩基を付加したネガティブコントロール、配列8：末端にT塩基を付加していない相補鎖、配列9～配列11：末端にT塩基を付加していないネガティブコントロール、配列12：ポジティブコントロール(末端にT塩基を付加した、配列4における相補鎖と異なる相補鎖)。

【0074】

【表2】表2

配列 シグナル検出

配列12	◎
配列4	◎
配列5	×
30 配列6	×
配列7	×
配列8	○
配列9	×
配列10	×
配列11	×

◎：非常に強いシグナルが観測された。

○：シグナルが観測された。

×：シグナルが観測されなかった。

40 【0075】以上の結果から、本発明の核酸の検出方法によれば、核酸の検出が非常に高感度かつ非常に明瞭なシグナルとして現れることが分かる。

【0076】

【実施例3】(1) 末端に重合した塩基を有する核酸の固定

ECH変性グリセロールトリアクリレート(長瀬産業(株))をDMF中でメチルトリメトキシホスホニウムアイオダイド(Aldrich(株)社製)で処理して、ECH変性グリセロールトリアクリレートの水酸基をよう素化した。次いで、得られた化合物と配列番号13～配列

番号17に示す塩基配列を有する5'末端がNH₂基で修飾されたオリゴヌクレオチド(18mer)を、弱アルカリ溶液中で加熱反応させた。得られたオリゴヌクレオチドにECH変性グリセロールトリアクリレートが導入されたことをHPLCを用いて確認した。

【0077】ECH変性グリセロールトリアクリレート導入オリゴヌクレオチドを、100ng/ μ lになるように2M NaCl/DMSOに溶解しDNA溶液とした。スポットター(GT MASS:日本レーザー電子(株)社製)を用い、上記製造例で得たカルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に、前記DNA溶液を2点ずつスポットした。次いで、UV STRAHLINKERTMを用いてUV照射(波長:254nm、1200mJ/cm²)を行なった。次いで、3%BSA(ウシ血清アルブミン)を含む緩衝液A(0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸(pH7.5)、0.05%トライトンX-100)に浸し、37℃にて15分間乾燥した。次に、このスライドガラスをTE緩衝液(10mMトリス塩酸(pH7.2)/1mMEDTA)で洗浄後、37℃にて15分間乾燥した。

【0078】(2)ハイブリダイゼーション
上記のスライドガラスのDNAを固定した部分に、ハイブリダイゼーション溶液[3×SSC(SSC:1.5M NaCl、0.15Mクエン酸ナトリウム)、10%デキストラン、1pmolCy5標識プローブ]30 μ lをのせ、42℃のウォーターバスで1晩加熱した。尚、プローブ核酸には、RNAポリメラーゼ β サブユニット(rpob)遺伝子を、Cy5標識したプローブを用いてPCRにより増幅し、得られた増幅産物(約110b)を用いた。

【0079】(3)ポストハイブリダイゼーション
ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取り、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行ない、非特異的に吸着したプローブを除去した。

【0080】[ポストハイブリダイゼーション洗浄条件

<110> 日清紡績株式会社(Nisshinbo Industries, Inc.)

<120> 固定化核酸及び核酸の検出法

<130> P-8222

<150> JP 2000-21843

<151> 2000-01-26

<160> 17

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 1

tttttttttt gttacccaca taccacgaat c

及びその条件]

(i) 2×SSC、0.1%SDS;室温5分間、2回

(ii) 0.3×SSC、0.1%SDS;40℃、5分間、2回

(iii) 2×SSC;室温、5分間

【0081】(4)ハイブリダイゼーションの検出

得られたスライドガラスをSCAN ARREY(GSI(株)社製)を用いて測定した。その結果、実施例2と同様に、配列番号13及び17のみに非常に強いシグナルを観測できた。なお、配列番号13~17に示す塩基配列の特徴は以下の通りである。配列番号13:相補鎖、配列番号14~16:ネガティブコントロール、配列番号17:ポジティブコントロール(配列番号13の相補鎖と異なる相補鎖)。

【0082】本発明の核酸の検出方法によれば、核酸の検出が非常に高感度でかつ非常に明瞭なシグナルとして現れることが分かる。

【0083】

【発明の効果】本発明により、安定に基材または基材上の担体上に固定化できる核酸が提供される。任意の核酸の末端にポリマーを付加することにより、基材または基材上の担体上に固定できる任意の核酸の量を増やすことができるため、検出感度を向上できる。

【0084】また、ポリマーと基材または基材上の担体が選択的に反応するため、ハイブリダイゼーションに必要な任意の核酸中の塩基を基材または基材上の担体との固定に用いることなく核酸検出を行うことができる。これにより、塩基配列の違いをより選択的に検出できる核酸検出法を提供できる。

【0085】さらに、核酸が強固に基材または基材上の担体に結合できるため、核酸固定化基材は、再現性、定量性に優れたDNAチップ等としての用途に有効な核酸固定化基材となり得る。

【0086】

【配列表】

15
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 2
gttaccacaca taccacgaat c
<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 3
tttttttttt ttcttctcag tgcgcaaatt
<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 4
tttttttttt aattcatggt ccagaaca
<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 5
tttttttttt aattcatgga ccagaaca
<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 6
tttttttttt aattcatggg ccagaaca
<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 7
tttttttttt aattcatggc ccagaaca
<210> 8

16

21

30

28

28

28

28

17
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 8
aattcatggt ccagaaca 18
<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 9
aattcatgga ccagaaca 18
<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 10
aattcatggg ccagaaca 18
<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 11
aattcatggc ccagaaca 18
<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 12
ttttttttt agctgagcca attcatgg 28
<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<400> 13
aattcatggt ccagaaca 18
<210> 14
<211> 18
<212> DNA

19

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 14

aattcatgga ccagaaca

18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 15

aattcatggg ccagaaca

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 16

aattcatggc ccagaaca

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 17

agctgagcca attcatgg

18

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

ターマコード (参考)

G 0 1 N 33/543

5 2 5

G 0 1 N 37/00

1 0 2

33/566

C 1 2 N 15/00

F

37/00

1 0 2

Z N A A

(72) 発明者 守屋 彰梧

千葉県千葉市緑区大野台 1-2-3 日清

紡績株式会社研究開発センター内

F ターム (参考)

4B024 AA11 CA01 HA14 HA19

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15

4B063 QA01 QQ16 QQ17 QQ19 QQ42

QQ52 QR08 QR33 QR35 QR42

QR56 QS25 QS34 QS39 QX02

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)